

P-6 冬季にカラマツ木部に蓄積するデハイドリンタンパク質の機能評価

北大院農 ○坂本友陽、岡田香織、鈴木伸吾、宇梶慎子、荒川圭太

【緒言】

一般に、厳しい低温にともなって生じる凍結は、植物にとって致命的な細胞内凍結を引き起こす可能性がある環境刺激である。樹木の細胞ではこの細胞内凍結を防ぐため、組織や器官ごとに様々な凍結適応機構を示す。寒冷な地域でも生育するカラマツなどの木部柔細胞では、冬季に厳しい氷点下温度に曝されるのにも関わらず、細胞内の水を液体状態に保つ深過冷却と呼ばれる機構により氷点下温度に適応している。この深過冷却能力は、秋から冬にかけて季節的な低温馴化の過程において上昇するため、低温馴化で誘導される可溶性糖やタンパク質群、遺伝子群の種類や性質、深過冷却能における役割について解析してきた (Kasuga et al. 2007, Takata et al. 2005, Wang et al. 2011)。なかでも Takata ら (2005) は、カラマツ木部において Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質の一種であるデハイドリンをコードする 7 種類の遺伝子 (*LkDHN1* ~ 7) が冬季に誘導されることを発見した。このデハイドリンは、そもそも乾燥や低温などのストレス耐性に関与が示されているものである。そこで本研究では、このデハイドリンがカラマツ木部柔細胞において深過冷却機構にどう関わっているのかを調べるため、それらの組換えタンパク質を調製して、その機能について検証を行うことにした。

【実験方法】

・組換えデハイドリンタンパク質の大量発現、精製

高田 (2005) が以前に His タグ融合型組換えタンパク質の発現用プラスミド (pET100/D-TOPO, Invitrogen) にカラマツ木部柔細胞の冬季誘導性遺伝子 *LkDHN1* ~ 7 を挿入して作製した rLkDHNs の発現用プラスミドを増幅した後、組換えタンパク質発現用の大腸菌 (BL21 Star™ (DE) One Shot Cell, Invitrogen) に導入し、組換えデハイドリン rLkDHNs を大量に発現させた。

rLkDHNs の検出は、SDS-PAGE ならびにイムノブロットングによって行った。なお抗体には抗 His タグ抗体、抗デハイドリン K-segment 抗体を用いた。rLkDHNs は His タグアフィニティカラム (His Trap HP, GE Healthcare) を用い、添付のプロトコルに従って精製した。

・rLkDHNs の不凍活性 (氷晶成長阻害活性) の測定

rLkDHNs を 2 mg/ml に調製し、そこから 2 μ l 分取して低温ステージ上に乗せ、試料を -20°C で凍結させた後、昇温して小さな結晶を残した。その後、-0.1°C/min で緩速冷却して、その氷晶が徐々に成長する様子を低温顕微鏡 (ECLIPSE 50i, Nikon) で観察した。なお、ポジティブコントロールとして不凍タンパク質を含むワカサギの粗抽出液を用いた。

・rLkDHNs の凍害保護活性の測定

凍結により著しく活性が低下することが知られている乳酸脱水素酵素 (LDH) を用いて凍害保護活性を測定した。LDH 溶液と試料溶液 (rLkDHNs, ウシ血清アルブミン (BSA), または sucrose) を混合し、混合液を -20°C で 24 時間静置して凍結させ、その後 15 分間室温で解凍した。これを基質溶液と混合させ、基質濃度の減少を測定することで LDH 活性を測った後、酵素の残存活性をもって凍害保護活性を評価した。なお、残存活性の計算方法は以下の通りである。

$$* \text{残存活性}(\%) = \frac{\{\text{試料添加LDH溶液(凍結)の活性}\} - \{\text{試料未添加LDH溶液(凍結)の活性}\}}{\{\text{試料未添加LDH溶液(未凍結)の活性}\} - \{\text{試料未添加LDH溶液(凍結)の活性}\}} \times 100$$

【結果および考察】

1. rLkDHN5 の調製

7種類あるデハイドリンの発現段階で最も多く集めることができた rLkDHN5 についてまずは実験を行うことにした。図1は rLkDHN5 の精製段階におけるサンプルの SDS-PAGE の結果である。rLkDHN5 が大腸菌内で発現され、これがアフィニティカラムで高度に精製されたのが分かる。

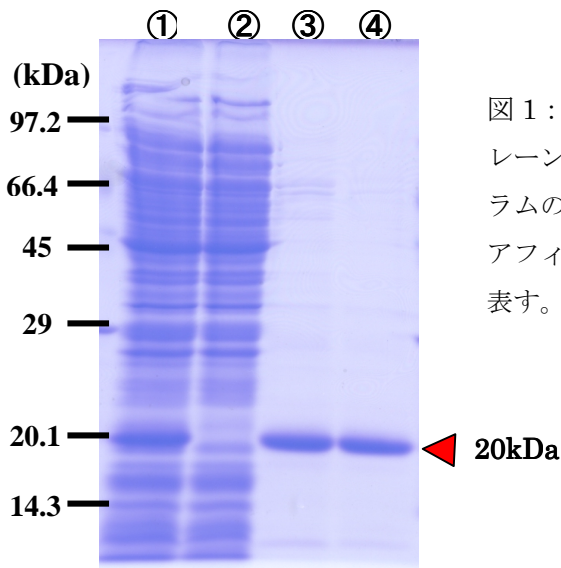


図1：rLkDHN5 のアフィニティ精製結果

レーン①rLkDHN5 発現後の大腸菌粗抽出液②His タグアフィニティカラムの素通り画分③アフィニティ精製（1回目）後の rLkDHN5 画分④アフィニティ精製（2回目）後の rLkDHN5 画分。矢頭は rLkDHN5 を表す。

2. rLkDHN5 の不凍活性

不凍タンパク質を含むワカサギの粗抽出液では、限られた氷点下温度域で氷晶が六角形やバイピラミダルな形状をとり、氷晶の成長が阻害されている様子が観察された。それに対し、1 mg/ml の rLkDHN5 を含む溶液では、バッファーのみの場合と同じように、氷晶はそのまま成長していったため、rLkDHN5 では目立った不凍活性は見られなかった。

3. rLkDHN1, 5 の凍害保護活性

凍害保護活性については、rLkDHN1, 5 について測定を行った。なお、コントロールとして BSA, sucrose, ovalbumin を用い、これらと rLkDHNs が持つ保護効果について比較した。

rLkDHN5 は、添加したサンプルの中でも BSA と並んで最も高い残存活性を示し、凍害保護活性を持つ事が示唆された。rLkDHN1 も rLkDHN5 とほぼ同程度の残存活性を示した。

表1：rLkDHN1, 5 の凍害保護活性測定と比較

sample(100 µg/ml)	残存活性
BSA	90%
sucrose	10%
ovalbumin	70%
rLkDHN1	85%
rLkDHN5	90%

デハイドリンをコードする遺伝子は、カラマツ木部柔細胞において冬季特異的に誘導されることから、デハイドリンは何らかの形でカラマツの越冬機構に関与していると思われる。今回の実験から rLkDHN1, 5 の凍害保護活性が検出された。これから、ドロップレット凍結法などを行い、過冷却促進活性等の測定を行っていく予定である。また、今回は rLkDHN1, 5 の機能評価から始めたため、それ以外の 5 種類の組換えデハイドリンについても、rLkDHNs が調製出来次第同様に活性測定が必要である。